



دانشگاه علوم پزشکی و خدمات بهداشتی درمانی قزوین

دانشکده پیراپزشکی

پایان نامه جهت اخذ درجه کارشناسی ارشد در رشته زیست فناوری پزشکی

عنوان:

**بررسی میزان بیان اینترلوکین ۲ در سلول های بنیادی مزانشیمی پرده
آمنیون ترانسفکت شده با پلاسمید حاوی ژن اینترلوکین ۲**

استاد راهنما:

دکتر محمد حسین احمدی_دکتر فرشاد فروغی مقدم

استاد مشاور:

دکتر مهدی آزاد

نگارش:

سعید انواری

چکیده

سابقه و هدف: استفاده از سلول بنیادی مزانشیمی (MSC) بواسطه ی خواص منحصر به فرد این سلول ها در سلول درمانی و نیز مطالعات بیولوژیک به سرعت رو به گسترش است. در این بین استفاده از پرده آمینون به عنوان منبع غنی از MSC مورد توجه ویژه ای قرار گرفته است. پرده آمینون برای سالها در بالین به عنوان بافت التیام بخش زخم های سوختگی برای پیشبرد شکل گیری بافت اپی تلیالی و جلوگیری از عفونت به کار رفته است. در سالهای اخیر بسیاری از محققان استفاده از MSC به منظور مطالعات بیولوژیک خارج از بدن مورد توجه قرار داده اند. با توجه به اینکه این سلول های مترشحه فعال، بسیاری از فاکتور ها و سیتوکین های مورد نیاز جهت رشد سایر سلول ها را ترشح می کنند استفاده از آنها به عنوان سلول تغذیه کننده (Feeder) در هم کشتی با سایر سلول ها بویژه سلول های سیستم ایمنی مورد توجه قرار گرفته است. در این مطالعه سعی شد با انتقال ژن اینترلوکین ۲ در قالب پلاسمید بیانی به MSC های پرده آمینون توانایی این سلول ها را به عنوان سلول مترشحه اینترلوکین ۲ مورد بررسی قرار گیرد.

مواد و روش ها: در ابتدا پلاسمید مورد نظر در باکتری اکلای سویه Hst08 کلون سازی شد. سپس سلول های بنیادی مزانشیمی از پرده آمینون بافت جفت استخراج شد. سلول های استخراج شده در پاساژ ۳ داخل پلیت های کشت سلولی ۲۴ خانه کشت داده شد و پلاسمید مورد نظر با استفاده از لیپوفکتامین ۲۰۰۰ به داخل سلول های بنیادی مزانشیمی ترانسفکت شد و با استفاده از تکنیک الیزا در روزهای ۳، ۶، ۹، ۱۲، ۱۵ محیط کشت رویی سلول ها از نظر مقدار اینترلوکین ۲ مورد بررسی قرار گرفت. همچنین بوسیله تکنیک فلوسیتومتری، میکروسکوپی و Real-time pcr در روز های اشاره شده، سلول ها از جهت بیان ژن GFP و درصد سلول های ترانسفکت شده مورد بررسی قرار گرفتند.

نتایج: میزان تولید سیتوکین IL-2، بیان پلاسمید و درصد سلولهای GFP مثبت در طول هفته اول و دوم بعد از لیپوفکشن و مقایسه آن با سلولهای دست نخورده نشان داد کلیه تستها در مورد سلولهایی که توسط لیپوفکتامین و پلاسمید حاوی ژن IL-2 ترانسفکت شده بودند نسبت به سلولهای دست نخورده نتایج معناداری داشتند در صورتی که این روند در مورد سلولهای ترانسفکت شده در روزهای مختلف بعد از ترانسفکشن فقط در میزان بیان mRNA پلاسمید معنادار بود. در مقایسه کلی روز های مختلف بیشترین غلظت اینترلوکین ۲ مربوط به روز ۱ با مقدار 611 Pg/ml بود که تا روز ۱۵ در مقدار تولید اینترلوکین ۲ روند کاهشی مشاهده شد.

واژه های کلیدی: سلول های بنیادی مزانشیمی، اینترلوکین ۲، پلاسمید، ترانسفکشن، لیپوفکتامین

Investigation The amount of expression IL-2 in amnion mesenchymal stem cell transfected with expression plasmid IL-2

introduction: The use of mesenchymal stem cells(MSC) due to the unique properties of these cells in cell therapy and biological studies also rapidly expanding. The use of amniotic membrane as a rich source of MSC has received special attention. for years Amniotic membrane As a healing tissue, used to Development epithelial tissue and prevent the formation of infection. these activated secretory cells, secrete many factors and cytokines required for the growth of other cells. They serve as a feeder cells in co-culture Particularly the immune cells. In this study, we tried to interleukin 2 gene transfer In the expression plasmid structure to Amniotic membrane mesenchymal stem cell And investigate the ability of these cells to secretion interleukin-2 cytokine

Method: The expression plasmid (pCMV3-IL2-GFPSpark) was cloned into E.coli HST08. Then mesenchymal stem cells were isolated from placental tissue amniotic membrane. isolated cells were cultured in passage 3 in 24-well cell culture plates And plasmid were transfected into the mesenchymal cells using lipofectamine 2000. The supernatant of transfected cells was evaluated for the amount of interleukin-2 By Elisa test on days 3,6,9,12 and 15. Also on the days indicated by flowcytometry, Real-time PCR Cells were examined for GFP gene expression and percentage of transfected cells.

Results: The amount of interleukin 2 secreted from transfected cells, GFP positive cells and plasmid expression During the first and second weeks after lipofection Comparison with untransfected cells were significant. The highest concentration of interleukin 2 was related to day 1 with 611pg/ml and Until day 15 there was a decreasing trend in the amount of interleukin 2 production

Keywords: mesenchymal stem cell, interleukin 2, plasmid, Transfection, lipofectamin



Qazvin University of Medical Sciences

Thesis to prehension of the degree of MSc in medical biotechnology

Title:

Investigation The amount of expression IL-2 in aminion mesenchymal
stem cell transfected with expression plasmid IL-2

Supervisors:

Dr. Mohamadhosein Ahmadi

Dr. Farshad Foroughi

Advisor:

Dr. Mehdi Azad

By:

Saeed Anvari

January 2020